

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT



REC'D 11 MAR 1998

WFO

PCT

Bescheinigung

Die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Epothilone C und D, Herstellung und Mittel"

am 18. November 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 D, C 07 F und A 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 12. Januar 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag



Zeichen: 196 47 580.5

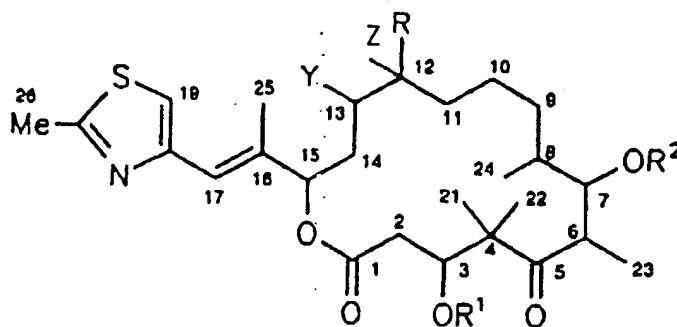
Hoiß

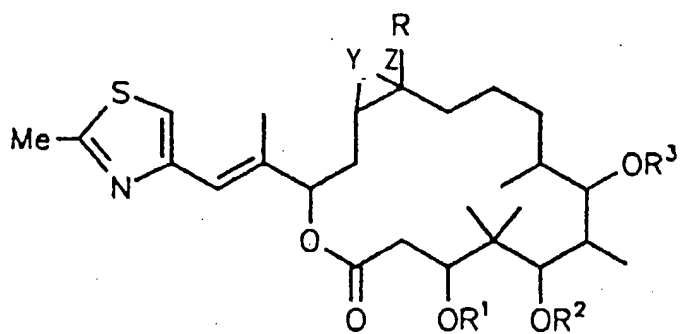
18. November 1996/he

Unser Zeichen: 8371-GBF

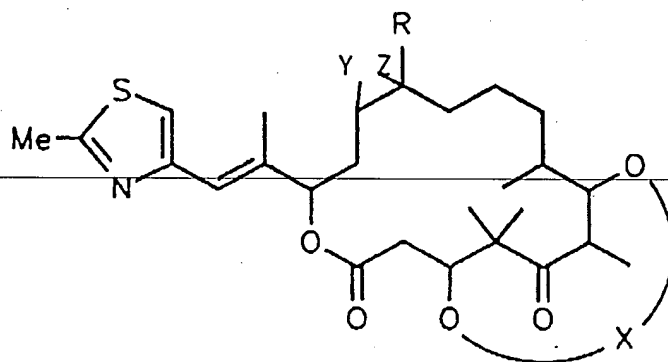
Epothilone C und D, Herstellung und Mittel

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

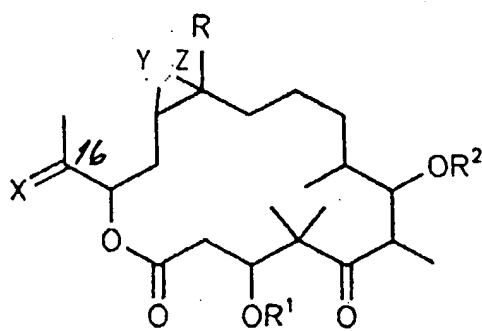




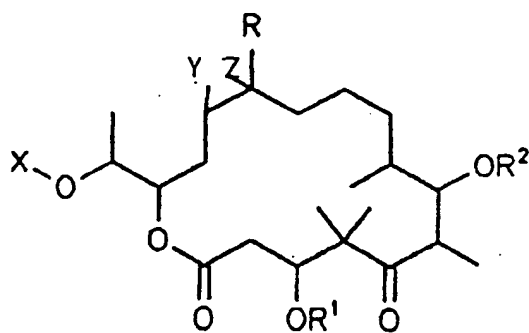
2



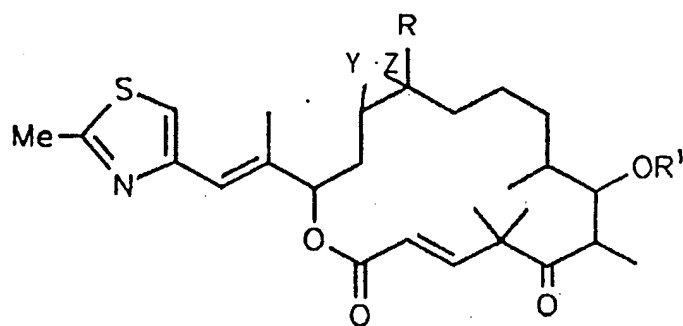
3



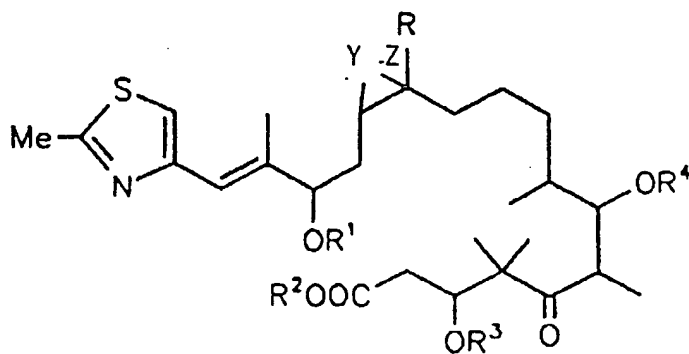
4



5



6



7

In den vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

R = H, C₁₋₄-Alkyl;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆-Alkyl,

C₁₋₆-Acyl-Benzoyl,

C₁₋₄-Trialkylsilyl,

Benzyl,

Phenyl,

C₁₋₆-Alkoxy-,

C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-

substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R¹ bis R⁵ zu der Gruppierung -(CH₂)_n- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;

Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder -N₃, OH, O-(C₁₋₆)-Acyl, O-(C₁₋₆)-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²-, wobei R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben, und -SiR₂-, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR³, N-NR⁴R⁵, und N-NHCONR⁴R⁵, wobei die Reste R³ bis R⁵ die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine $X = \text{Hal}$, $Y = \text{OH}$ und $Y = \text{OH}$, $Y = \text{Hal}$ erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH_3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit NaBH_4 in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflats ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH_3/MeOH , bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989;
Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und
Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann man auch von Epothilon C oder D ausgehen, wobei zur Derivatisierung auf die vorstehend beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann. Dabei kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin; oder epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure; oder in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilon-derivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:

Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 μ l (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I
4 mg (19 %) Isomer II

Isomer I

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ν = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: $C_{26}H_{40}O_6ClNS$ ber.: 529.2265 für $[M^+]$,
gef.: 529.2280

organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10). Ausbeute: 5 mg (18 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725
 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265
 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b,
 Sch), 737 (s) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: $C_{29}H_{40}O_9NSCl$ ber.: 613.2112 für $[M^+]$
gef.: 613.2131

Beispiel 4:

Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).
Ausbeute: 1 mg (9 %)



R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C₂₇H₄₂O₆NSCl ber.: 543.2421 für [M⁺]
gef.: 543.2405

Beispiel 5:
Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: C₂₆H₄₁O₆NS ber.: 495.2655 für [M⁺]
gef.: 495.2623

Beispiel 6:

Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 µl (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs),
1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s,
Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957
(s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch)
cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{\max} (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35)
nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M⁺]), 457 (22), 362 (16), 316
(27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151
(43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076
(w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br,
Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{\max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08)
nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306
(67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178
(32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113
(15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42),
41 (19).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1997

Beispiel 7:

Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch

präparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch),
1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267
(w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M⁺]), 380 (4), 267 (14), 249
(17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139
(34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43
(50).

Hochauflösung: C₂₁H₃₄O₇ ber.: 398.2305 für [M⁺]
 gef.: 398.2295

Beispiel 8:

Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 27 μ l (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdi-hydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 μ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch),
1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch),
1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179
(s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m)
cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M⁺]), 380 (21), 322 (37), 318
(40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151
(29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57
(26).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₅NS ber.: 475.2392 für [M⁺]
gef. 475.2384

Beispiel 9:

Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: C₂₇H₃₇O₆NS ber.: 503.2342 für [M⁺]
gef.: 503.2303

Beispiel 10:

Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanol-lösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (67 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M^+]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{NS}$ ber.: 517.2498 für [M^+]
gef.: 517 2492

Beispiel 11:
Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch),
1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383
(m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch),
1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s)
cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140
(100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: C₂₃H₃₇O₄NS ber.: 423.2443 für [M⁺]
gef.: 423.2410

Beispiel 12:

Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732
(vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246
(s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm⁻¹

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59)
nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: C₂₉H₄₅O₈NS ber.: 567.2866 für [M⁺]
 gef.: 567.2849

Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20 µl Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40 µl Triethylamin und 16 µl 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

Beispiel 15:

Epothilone C und D als Ausgangsverbindungen

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent.

B. Produktion mit DSM 6773

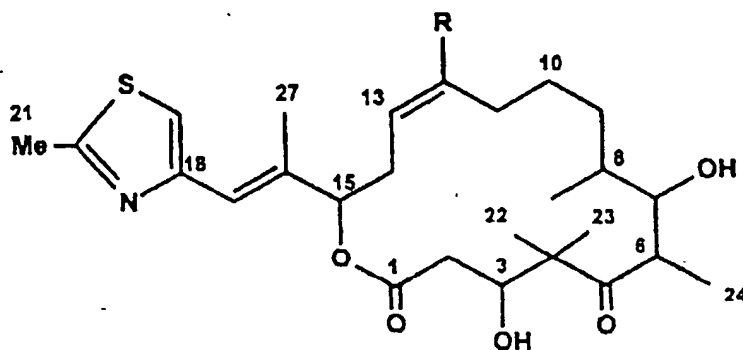
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Oyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 2 m³ Luft/h. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO₂ bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m², 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird. Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min

Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit $R_t = 90-95$ min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C R = H

Epothilon D R = CH₃

Epothilon C

C₂₆H₃₉NO₅S [477]

ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für [M+H]⁺

¹H und ¹³C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 11,5 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Epothilon D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für $[M+H]^+$

1H und ^{13}C siehe NMR-Tabelle

DC: R_f = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: R_t = 15,3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 $7\mu m$, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Tabelle: ^1H -und ^{13}C -NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei 300 MHz

Epothilon C				Epothilon D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H ₃	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H ₃	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H ₃	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H ₃	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H ₃	0.90			0.91	27	14.1
26-H ₃				1.63		
27-H ₃	2.10			2.11		

*, ** Zuordnung vertauschbar

Beispiel 15:

Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

Ausbeute:

25 mg Epothilon A, $R_t = 3,5$ min (analyt. HPLC, 7 μ m, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)
und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A, $R_t = 3.7$ min, ESI-MS (pos. Ionen)

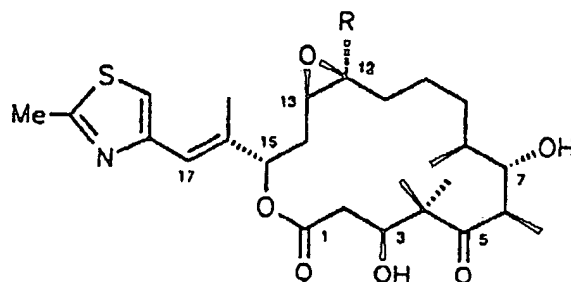
$m/z = 494 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ in $[\text{D}_4]$ Methanol, ausgewählte Signale: $\delta = 4.32$

(3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H),

3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69

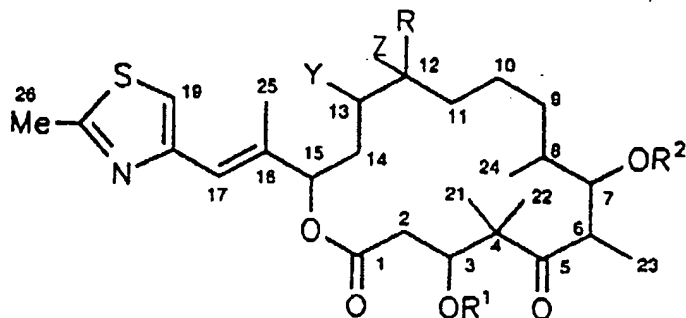
(17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A R = H

Patentansprüche

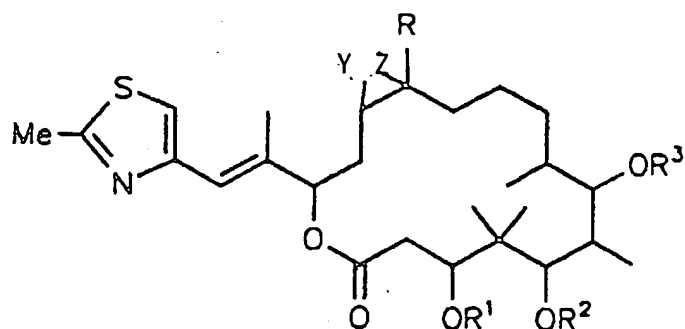
1. Epothilonderivat der Formel 1



1

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl},$ Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und Y und Z entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, Halogen, Pseudohalogen, OH, O-(C_{1-6})-Acyl, O-(C_{1-6})-Alkyl oder O-Benzoyl stehen oder gemeinsam das O-Atom eines Epoxids oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden, wobei Epothilon A und B ausgenommen sind.

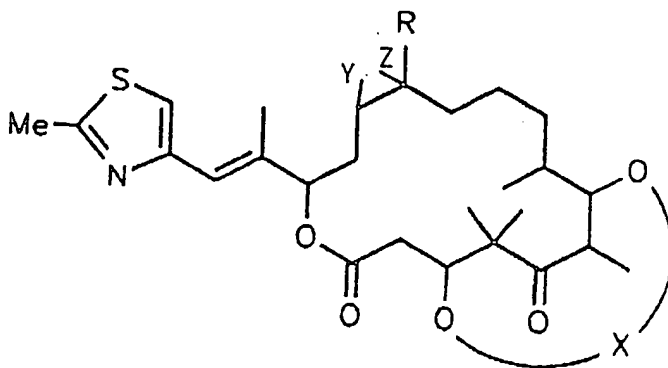
2. Epothilonderivat der Formel 2



2

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2, R^3 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl},$ Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

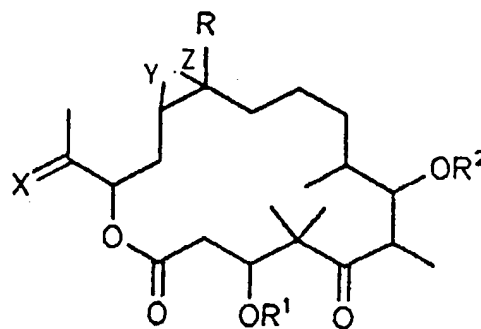
3. Epothilonderivat der Formel 3



3

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl},$
Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl;
es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-
gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X all-
gemein für $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-S(O)-$, $-CR^1R^2-$ und $-SiR_2-$ steht, wo-
bei R, R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben und R^1
und R^2 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoff-
atomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch
1 besitzen.

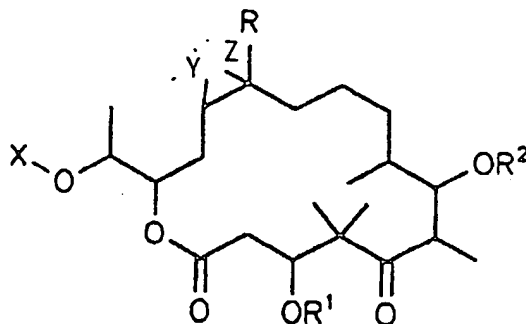
4. Epothilonderivat der Formel 4



4

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl},$
 $C_{1-6}\text{-Acyl}$, Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl
bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl-
bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, X
Sauerstoff, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$ bedeutet, wobei die
Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben und R^4 und
 R^5 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoff-
atomen bilden können; und
Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

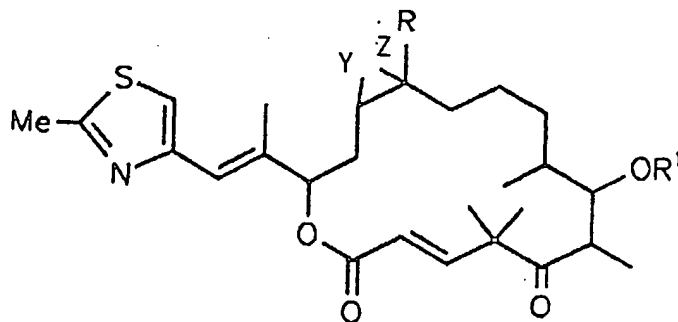
5. Epothilonderivat der Formel 5



5

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

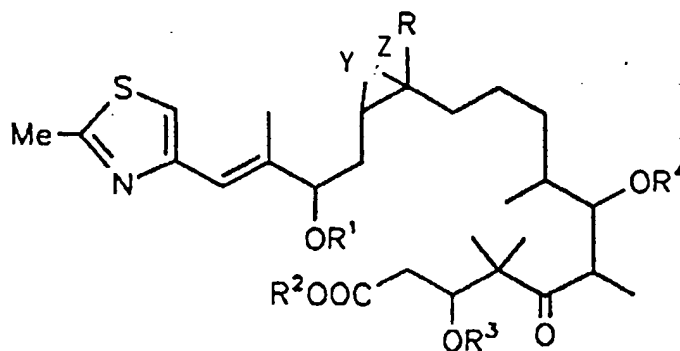
6. Epothilonderivat der Formel 6



6

wobei $R = H$, C_{1-4} -Alkyl und $R^1 = H$, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy-, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

7. Epothilonderivat der Formel 7



7

wobei $R = H$, C_{1-4} -Alkyl und $R^1, R^2, R^3, R^4 = H$, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch *gekennzeichnet*, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben

(a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder

(b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8

(a) nach der Yamaguchi-Methode oder

(b) nach der Corey-Methode oder

(c) nach der Kellogg-Methode

in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.

10. Verfahren zur Herstellung von Epothilon A und/oder 12,13-

Bisepi-epothilon A, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon C epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

11. Verfahren zur Herstellung von Epothilon B und/oder 12,13-

Bisepi-epothilon B, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon D epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

12. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

13. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder

mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

[stamp] PRIORITY DOCUMENT

[seal]

[stamp] Received March 11, 1998
WIPO PCT

Certification

On November 18, 1996, a patent application with the title

"Epothilones C and D, Synthesis and Agents"

was submitted to the German Patent Office by Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) [Society for Biotechnological Research mbH (GBF)] in Braunschweig, Germany.

The attached pages constitute a correct and accurate reproduction of the original documents of this patent application.

This patent application has been assigned the International Patent Classifications C 07 D, C 07 F and A 01 N on a provisional basis by the German Patent Office.

Munich January 12, 1998

The President of the German Patent Office

By Order

[signature]

Hoiss

Application No.: 196 47 580.5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

November 18, 1996/h3

Our ref: 8371-GBF

Epothilones C and D, Synthesis and Agents

The present invention relates to epothilone derivatives in general and their use for synthesis of pharmaceutical drugs. In particular the present invention relates to the synthesis of epothilone derivatives of general formulas 1 through 7 shown below as well as their use for production of therapeutic agents and agents for plant protection.

[insert 1-7]

In **formulas 1 through 7** above, the following meanings are applicable:

R = H, C₁₋₄ alkyl;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆ alkyl,
C₁₋₆ acyl-benzoyl,
C₁₋₄ trialkylsilyl,
benzyl,
phenyl,
C₁₋₆ alkoxy-,
C₆ alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl;

where two of the groups R¹ through R⁵ may also combine to form the -(CH₂)_n- group, where n = 1 to 6, and the alkyl and/or acyl groups contained in the moieties may be linear or branched moieties; Y and Z are either the same or different and each denotes hydrogen, halogen, such as F, Cl, Br or I, pseudohalogens such as -NCO, -NCS or -N₃, OH, O-(C₁₋₆)-acyl, O-(C₁₋₆)-alkyl, O-benzoyl. Y and Z may also denote the oxygen atom of an epoxy, whereby epothilones A and B are not claimed here, or they may form one of the C-C bonds of a C=C double bond.

In **formula 3**, X stands in general for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R², where R¹ and R² have the meanings given above and -SiR₂-, where R has the meaning given above.

In **formula 4**, X denotes oxygen, NOR³, N-NR⁴R⁵ and N-NHCONR⁴R⁵, where the R³ and R⁵ groups have the meanings given above.

In **formula 5**, X denotes hydrogen, C₁₋₁₈ alkyl, C₁₋₁₈ acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

For epothilones A and B, reference is made to German Patent Application 41 38 042. The compounds according to general **formula 1** are accessible by starting with epothilones A and B as well as their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by opening the 12,13-epoxides. To do so, hydrogen halides are used, preferably in a nonaqueous solvent, yielding the halohydrins $X = \text{Hal}$, $Y = \text{OH}$ and $Y = \text{OH}$, $Y = \text{Hal}$. In the presence of water, protonic acids such as toluenesulfonic acid and trifluoroacetic acid yield 12,13-diols, which are then acylated by standard methods (e.g., with carboxylic anhydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or alkylated (alkyl halides and silver oxide). The 3- and 7-hydroxy groups may be protected temporarily in the form of formates (cleavage with NH_3/MeOH) or *p*-methoxybenzyl ether (cleavage with DDQ).

The compounds of general **formula 2** are accessible from epothilones A and B as well as their 3-O- or 7-O-protected derivatives by reduction, e.g., with NaBH_4 in methanol. If 3-OH and/or 7-OH is reversibly protected in the process, then after acylation or alkylation and removal of the protective groups, it is possible to obtain 5-O-monosubstituted, 3,5- or 5,7-O-disubstituted derivatives of general **formula 2**.

Reactions of epothilones A and B with bifunctional electrophilic reagents such as thiophosgene, thiocarbonyl diimidazole, thionyl chloride or dialkylsilyl dichlorides and/or bistriflates yield compounds of general **formula 3**. Pyridine, trialkylamines, optionally together with DMAP and/or 2,6-lutidine in an aprotic solvent are used as auxiliary bases here. The 3,7-acetals of general **formula 3** are formed by reacetalization of dimethylacetals, e.g., in the presence of an acid catalyst.

The compounds of general **formula 4** are obtained from epothilones A and B and their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by ozonolysis and reductive workup, e.g., with dimethyl sulfide. The C_{16} ketones may then be converted to oximes, hydrazones or semicarbazones by standard methods with which those skilled in the art are familiar. They are also converted to $\text{C}_{16}/\text{C}_{17}$ olefins by olefination according to Wittig, Wittig-Horner, Julia or Petersen.

By reduction of the C_{16} keto group, e.g., with an aluminum hydride or boron hydride, the 16-hydroxy derivative according to **formula 5** are accessible. They may be selectively acylated or alkylated if 3-OH and 7-OH have been provided with corresponding protective groups. The 3-OH and 7-OH groups are released, e.g., by NH_3/MeOH in the case of O-formyl or by DDQ in the case of O-*p*-methoxybenzyl.

The compounds of general **formula 6** are obtained from derivatives of epothilones A and B in which the 7-OH group is protected by acyl groups or ether groups wherein the 3-OH group is formylated,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

mesylated or tosylated, for example, and then eliminated by treatment with a base, e.g., DBU. The 7-OH group may be released as described above.

The compounds of general **formula 7** are obtained from epothilones A and B or their 3-OH and 7-OH-protected derivatives by basic hydrolysis, e.g., with NaOH in MeOH or MeOH/water. Preferably compounds of general **formula 7** are obtained from epothilones A or B or their 3-OH or 7-OH-protected derivatives by enzymatic hydrolysis, in particular with esterases or lipases. The carboxyl group can be converted to an ester with diazoalkanes after protecting the 19-OH group by alkylation.

Furthermore, the compounds of **formula 7** may be converted to compounds of **formula 2** by lactonization according to the methods of Yamaguchi (trichlorobenzoyl chloride/DMAP), Corey (aldrithiol/triphenylphosphine) or Kellogg (ω -bromic acid/cesium carbonate). Relevant synthesis procedures can be found in

Inanaga et al. in *Bull. Chem. Soc. Japan*, 52 (1979), 1989,
Corey and Nicolaou in *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974), 5614 and
Kruizinga and Kellogg in *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981), 5183.

To synthesize the compounds according to this invention, it is also possible to start with epothilone C or D, whereby for derivatization, reference can be made to the derivatization methods described above. The 12,13-double bond may be selectively hydrogenated, e.g., catalytically or with diimine, or epoxidized, e.g., with dimethyldioxirane or a per acid, or converted to the dihalides, dipseudohalides or diazides.

This invention also relates to agents for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening comprising one or more of the epothilone derivatives described above and/or comprising one or more of the epothilone derivatives described above plus one or more conventional vehicle(s) and/or diluent(s).

Finally, this invention relates to therapeutic agents consisting of one or more of the compounds listed above or one or more of the compounds listed above plus one or more conventional vehicle(s) and/or diluent(s). These agents may have cytotoxic activities in particular and/or they may induce immunosuppression and/or they may be used to combat malignant tumors, in which case they are particularly preferably used as cytostatics.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

This invention is explained and described in greater detail below through the description of a few selected exemplary embodiments.

Examples

Example 1:

Compound 1a

20 mg (0.041 mmol) epothilone A is dissolved in 1 mL acetone, mixed with 50 μ L (0.649 mmol) trifluoroacetic acid and stirred overnight at 50°C. For workup, the reaction mixture is combined with 1M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. The raw product is purified with the help of preparative thin-layer chromatography (eluent: dichloromethane/acetone 85:15).

Yield: 4 mg (19%) isomer I

4 mg (19%) isomer II

Isomer I

R_f (dichloromethane/acetone 85:15): 0.46

IR (film): ν = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

High resolution: C₂₆H₃₉O₆NS calculated: 493.2498 for [M-H₂O]⁺
found: 493.2478

Isomer II

R_f (dichloromethane/acetone 85:15): 0.22

IR (film): ν = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 [M-H₂O]⁺), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: C₂₆H₃₉O₆NS calculated: 493.2498 for [M-H₂O]⁺
found: 493.2475

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 2:**Compound 1b**

55 mg (0.111 mmol) epothilone A is dissolved in 0.5 mL tetrahydrofuran, mixed with 0.5 [sic; 0.5?] mL 1N hydrochloric acid and stirred for 30 minutes at room temperature. Then it is mixed with 1N phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of solvent. The raw product is purified with the help of preparative thin-layer chromatography (eluent: dichloromethane/methanol 90:10). Yield: 19 mg (32%).

R_f (dichloromethane/methanol 90:10): 0.46

IR (film): ν = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m),
1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1} .

UV (methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M^+]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100),
140 (31), 113 (15), 57 (16).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{ClNS}$: calculated: 529.2265 for [M^+]
found: 529.2280

Example 3:**Compound 1c**

25 mg (0.047 mmol) 12-chloro-13-hydroxy-epothilone A (1b) is dissolved in 1 mL dichloromethane, mixed with 29 mg (0.235 mmol) dimethylaminopyridine, 151 μL (1.081 mmol) triethylamine and 20 μL (0.517 mmol) 98% formic acid. The reaction mixture is cooled with ice/sodium chloride. After reaching -15°C , 40 μL (0.423 mmol) acetic anhydride is added to the reaction mixture and stirred for 70 minutes at -15°C . After a thin-layer chromatogram indicates that the reaction is not complete, 6 mg (0.047 mmol) more dimethylaminopyridine is added to the reaction mixture along with 7 μL (0.047 mmol) triethylamine, 2 μL 98% formic acid (0.047 mmol) and 4 μL (0.047 mmol) acetic anhydride and the mixture is stirred for 60 minutes. For workup, the reaction mixture is heated to room temperature, mixed with 1M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. The raw product is purified with the help of preparative thin-layer chromatography (eluent: dichloromethane/acetone 90:10). Yield: 5 mg (18%).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

R_f (dichloromethane/acetone 90:10): 0.67

IR (film): ν = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch),
1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M^+]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100),
151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{NSCl}$ calculated: 613.2112 for [M^+]
found: 613.2131

Example 4:

Compound 1d

10 mg (0.020 mmol) epothilone B is dissolved in 0.5 mL tetrahydrofuran, mixed with 0.5 mL 1N hydrochloric acid and stirred for 30 minutes at room temperature. Then this is mixed with 1M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. The raw product is purified with the help of preparative thin-layer chromatography (eluent: dichloromethane/acetone 85:15). Yield: 1 mg (9%).

R_f (dichloromethane/acetone 85:15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M^+]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23),
164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

High resolution: $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{NSCl}$ calculated: 543.2421 for [M^+]
found: 543.2405

Example 5:

Compound 2a

100 mg (0.203 mmol) epothilone A are dissolved in 4 mL tetrahydrofuran/1M phosphate buffer, pH 7 (1:1), and mixed with sodium borohydride (150 mg = 3.965 mmol) until the educt has reacted completely according to the thin-layer chromatogram. Then the mixture is diluted with 1M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. The raw product is purified by silica chromatography (eluent: dichloromethane/acetone 95:5 gradient after dichloromethane/acetone 85:15).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Yield: (20%)

R_f (dichloromethane/acetone 75:25): 0.27

IR (film): ν = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M^+]), 477 (8), 452 (12), 294 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{NS}$ calculated: 495.2655 for [M^+]
found: 495.2623

Example 6:

Compounds 3a-d (a-d are stereoisomers)

100 mg (0.203 mmol) epothilone is dissolved in 3 mL pyridine, mixed with 50 μL (0.686 mmol) thionyl chloride and stirred for 15 minutes at room temperature. Then the mixture is combined with 1M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. The raw product is purified and the four stereoisomers **3a-d** are separated with the help of preparative thin-layer chromatography (eluent: toluene/methanol 90:10).

Compound 3a

Yield: 4 mg (12%)

R_f (toluene/methanol 90:10): 0.50

IR (film): ν = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm^{-1} .

UV (methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M^+]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]

Compound 3b

Yield: 14 mg (13%)

R_f (toluene/methanol 90:10): 0.44

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IR (film): ν = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, be, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm^{-1} .

UV (methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M^+]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]
found: 539.1998

Compound 3c

Yield: 4 mg (4%)

R_f (toluene/methanol 90:10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M^+]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]
found: 539.2001

Compound 3d

Yield: 1 mg (1%)

R_f (toluene/methanol 90:10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M^+]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]
found: 539.1997

Example 7:

Compound 4a

10 mg (0.020 mmol) epothilone A is dissolved in 2 mL dichloromethane, cooled to -70°C and then treated for 5 minutes with ozone until a faint blue color appears. The resulting reaction mixture is then mixed with 0.5 mL dimethyl sulfide and heated to room temperature. For workup, the reaction mixture is freed of the solvent and finally purified by preparative thin-layer chromatography (eluent: dichloromethane/acetone/methanol 85:10:5).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Yield: 5 mg (64%)

R_f (dichloromethane/acetone/methanol 85:10:5): 0.61

IR (film): ν = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w),
1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1} .

UV (methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M^+]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26),
171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

High resolution: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_7$ calculated: 398.2305 for [M^+]
found: 398.2295

Example 8:

Compound 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-di-O-formyl-epothilone A is dissolved in 1 mL dichloromethane, mixed with 27 μL (0.180 mmol) 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU) and stirred for 60 minutes at room temperature.

For workup, the reaction mixture is combined with 1M monobasic sodium phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. After eliminating the solvent, the resulting raw product is dissolved in 1 mL methanol, mixed with 200 μL of an ammoniacal methanol solution (2 mmol NH_3/mL methanol) and stirred over night at room temperature. For workup, the solvent is removed *in vacuo*.

Yield: 4 mg (22%)

R_f (dichloromethane/acetone 85:15): 0.46

IR (film): ν = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w),
1466 (m, Sch), 1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch),
984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm^{-1} .

UV (methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M^+]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31),
166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{NS}$ calculated: 475.2392 for [M^+]
found: 475.2384

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 9:**Compound 6b**

50 mg (0.091 mmol) 3,7-di-O-formyl-epothilone A is dissolved in 1 mL dichloroethane, mixed with 2 mL (0.013 mol) 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU) and stirred for 12 hours at 90°C. For workup, the reaction mixture is combined with 1M monobasic sodium phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. The raw product consisting of two compounds is purified by preparative thin-layer chromatography (eluent: dichloromethane/acetone 90:10).

Yield: 7 mg (15%)

Substance code

R_f (dichloromethane/acetone 90:10): 0.62

IR (film): ν = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w),
1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch),
735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (methanol): λ_{\max} (lg ϵ) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21),
206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28),
113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

High resolution: C₂₇H₃₇O₆NS calculated: 503.2342 for [M⁺]
found: 503.2303

Example 10:**Compound 6c**

5 mg (0.009 mmol) 3,7-di-O-acetyl-epothilone is dissolved in 1 mL methanol, mixed with 150 μ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmol NH₃/mL methanol) and stirred over night at 50°C. For workup, the solvent is removed *in vacuo*. The raw product is purified with the help of preparative thin-layer chromatography (eluent: toluene/methanol 90:10).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Yield: 3 mg (67%)

R_f (dichloromethane/acetone 90:10): 0.55

IR (film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch),
1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s),
963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1} .

UV (methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M^+]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100),
151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

High resolution: $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{NS}$ calculated: 517.2498 for [M^+]
found: 517.2492

Example 11:

Compound 7a

20 mg (0.041 mmol) epothilone is dissolved in 0.5 mL methanol, mixed with 0.5 mL 1N sodium hydroxide solution and stirred for 5 minutes at room temperature.

For workup, the reaction mixture is combined with 1M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed of the solvent. The raw product is purified with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: dichloromethane/methanol 85:15).

Yield: 11 mg (52%)

R_f (dichloromethane/acetone 85:15): 0.92

IR (film): ν = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m),
1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch),
1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M^+]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

High resolution: $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{NS}$ calculated: 423.2443 for [M^+]
found: 423.2410

Example 12:

Compound 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-acetyl-epothilone is dissolved in 1 mL methanol, combined with 200 μL of an ammoniacal methanol solution (2 mmol NH_3/mL methanol) and stirred for 2 days at 50°C. For

THIS PAGE BLANK (USPTO)

workup, the solvent is removed *in vacuo*. The raw product is purified with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: toluene/methanol 90:10).

Yield: 3 mg (59%)

R_f (dichloromethane/acetone 90:10): 0.63

IR (film): ν = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1} .

UV (methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M^+]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 7 (22), 43 (27).

High resolution: $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{NS}$ calculated: 567.2866 for [M^+]
found: 567.2849

Example 13:

50 mg epothilone A is partially dissolved in 20 μL dimethyl sulfoxide and diluted with 30 mL phosphate buffer (pH 7.1, 30 mM). After adding 5 mg swine liver esterase (Boehringer Mannheim), the mixture is stirred for 2 days at 30°C, then acidified with 2N HCl to a pH of 5 and the epothilone acid 7 is extracted with ethyl acetate. The organic phase is dried with sodium sulfate and evaporated *in vacuo* until dry. Yield 48 mg (96%).

Example 14:

48 mg epothilone acid 7 is dissolved in 6 mL abs. THF and mixed with 40 μL triethylamine and 16 μL 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride while stirring. After 15 minutes, the precipitate is filtered out and then added by drops within 15 minutes to a boiling solution of 20 mg 4-dimethylamino-pyridine in 200 mL abs. toluene while stirring rapidly. After 10 more minutes, the mixture is evaporated *in vacuo* and the residue is distributed between ethyl acetate and citrate buffer (pH 4). The residue on evaporation of the organic phase yields 15 mg epothilone A after preparative HPLC separation.

Example 15:

Epothilones C and D as starting compounds

A. Production strain and culture conditions according to the epothilone basic patent

THIS PAGE BLANK (USPTO)

B. Production with DSM 6773

75 L of culture are cultured as described in the basic patent and used to inoculate a production fermenter containing 700 L of production medium consisting of 0.8% starch, 0.2% glucose, 0.2% soy meal, 0.2% yeast extract, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L Fe-EDTA, pH 7.4 and optionally 15 liters of Amberlite XAD-16 adsorber resin. Fermentation lasts for 7 to 10 days at 30°C, aeration with 2 m³ air per hour. By regulating the rotational speed, the pO₂ is kept at 30%.

C. Isolation

The adsorber resin is separated from the culture using a 0.7 m², 100 mesh process filter and is freed of polar contaminants by washing with three bed volumes of water/methanol 2:1. By elution with four bed volumes of methanol, a crude extract is obtained and then evaporated *in vacuo* until the aqueous phase is obtained. This is extracted three times with an equal volume of ethyl acetate. Evaporating the organic phase yields 240 g crude extract which is distributed between methanol and heptane to separate the lipophilic impurities. By evaporating *in vacuo*, 180 g raffinate is obtained from the methanol phase and then fractionated in three portions over Sephadex LH-20 (column 20 × 100 cm, 20 mL/min methanol). The epothilones are present in a total amount of 72 g in the fraction eluted with a retention time of 240 to 300 minutes. To separate the epothilones, they are chromatographed in three portions on Lichrosorb RP-18 (15 µm, column 10 × 40 cm, eluent methanol/water 65:35, 180 mL/min). After epothilones A and B, epothilone C is eluted at R_t = 90 to 95 min and epothilone D is eluted at 100 to 110 min and then after evaporating *in vacuo*, they are obtained as colorless oils in a yield of 0.3 g each.

D. Physical properties

[insert]

Epothilone C R = H

Epothilone D R = CH₃

Epothilone C

C₂₆H₃₉NO₅S [477]

ESI-MS: (positive ions): 478.5 for [M + H]⁺

¹H and ¹³C: see NMR table.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TLC: $R_f = 0.82$

TLC aluminum foil 60 F 254 Merck, eluent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinction at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray color on heating to 120°C

HPLC: $R_t = 11.5$ min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μ m, 125 \times 4 mm

Eluent: Methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min

Detection: Diode array

Epothilone D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (positive ions): 492.5 for $[M + H]^+$

1H and ^{13}C : see NMR table.

TLC: $R_f = 0.82$

TLC aluminum foil 60 F 254 Merck, eluent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinction at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray color on heating to 120°C

HPLC: $R_t = 15.3$ min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μ m, 125 \times 4 mm

Eluent: Methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min

Detection: Diode array

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data on epothilone C and epothilone D in $[\text{D}_6]$ DMSO at 300 MHz.

H atom	Epothilone C		Epothilone D	
	δ (ppm)	C atom	δ (ppm)	C atom
		1	170.3	1
2-Ha	2.38	2	38.4	2
2-Hb	2.50	3	71.2	3
3-H	3.97	4	53.1	4
3-OH	5.12	5	217.1	5
6-H	3.07	6	45.4	6
7-H	3.49	7	75.9	7
7-OH	4.46	8	35.4	8
8-H	1.34	9	27.6	9
9-Ha	1.15	10	30.0	10
9-Hb	1.40	11	27.6	11
10-Ha	1.15*	12	124.6	12
10-Hb	1.35*	13	133.1	13
11-Ha	1.90	14	31.1	14
11-Hb	2.18	15	76.3	15
12-H	5.38**	16	137.3	16
13-H	5.44**	17	119.1	17
14-Ha	2.35	18	152.1	18
14-Hb	2.70	19	117.7	19
15-H	5.27	20	164.2	20
17-H	6.50	21	18.8	21
19-H	7.35	22	20.8	22
21-H ₃	2.65	23	22.6	23
22-H ₃	0.94	24	16.7	24
23-H ₃	1.21	25	18.4	25
24-H ₃	1.06	27	14.2	26
25-H ₃	0.90			27
26-H ₃				
27-H ₃	2.10			

*, ** Assignment interchangeable

Example 15 [sic; 16]:

Epothilone A and 12,13-bisepi-epothilone A from epothilone C

50 mg epothilone A is dissolved in 1.5 mL acetone and mixed with 1.5 mL of a 0.07 molar solution of dimethyldioxirane in acetone. After standing for six hours at room temperature, the mixture is evacuated *in vacuo* and separated by preparative HPLC on silica gel (eluent: methyl-*tert*-butyl ether/petroleum ether/methanol 33:66:1).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Yield:

25 mg epothilone A, $R_t = 3.5$ min (analytical HPLC, 7 μ m, column 4 \times 250 mm, eluent: see above, flow rate 1.5 mL/min)

and

20 mg 12,13-bisepi-epothilone A, $R_t = 3.7$ min, ESI-MS (positive ions)

$m/z = 494 [M + H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ in $[\text{D}_4]$ methanol, selected signals: $\delta = 4.32$ (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).

[insert]

12,13-bisepi-epothilone A $R = \text{H}$

Patent Claims

1. Epothilone derivative of formula 1

[insert]

where $R = \text{H}$, C_{1-4} alkyl; $R^1, R^2 = \text{H}$, C_{1-6} alkyl, C_{1-6} acyl, benzoyl, C_{1-4} trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6} alkoxy, C_6 alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl; and the alkyl and acyl groups present in the moieties are linear or branched groups, and Y and Z may be either the same or different and each denotes hydrogen, halogen, pseudohalogen, OH, O-(C_{1-6})-acyl, O-(C_{1-6})-alkyl or O-benzoyl or together they form the oxygen atom of an epoxy or one of the C-C bonds of a C=C double bond, excluding epothilones A and B.

2. Epothilone derivative of formula 2

[insert]

where $R = \text{H}$, C_{1-4} alkyl; $R^1, R^2, R^3 = \text{H}$, C_{1-6} alkyl, C_{1-6} acyl, benzoyl, C_{1-4} trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6} alkoxy, C_6 alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl; the alkyl and acyl groups present in the moieties are linear or branched groups; and Y and Z have the meanings according to Claim 1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3. Epothilone derivative of formula 3

[insert]

where R = H, C₁₋₄ alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ acyl, benzoyl, C₁₋₄ trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆ alkoxy, C₆ alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl; the alkyl and acyl groups present in the moieties are linear or branched groups, and X denotes in general -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R² and -SiR₂- where R, R¹ and R² have the meanings given above and R¹ and R² together may also form an alkylene group with 2 to 6 carbons; and Y and Z have the meanings according to Claim 1.

4. Epothilone derivative of formula 4

[insert]

where R = H, C₁₋₄ alkyl; R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ acyl, benzoyl, C₁₋₄ trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆ alkoxy, C₆ alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl; the alkyl and acyl groups present in the moieties are linear or branched groups, X denotes oxygen, NOR³, N-NR⁴R⁵ and N-NHCONR⁴R⁵, where the R³ and R⁵ groups have the meanings given above and R⁴ and R⁵ together may also form an alkylene group with 2 to 6 carbons; and Y and Z have the meanings according to Claim 1.

5. Epothilone derivative of formula 5

[insert]

where R = H, C₁₋₄ alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ acyl, benzoyl, C₁₋₄ trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆ alkoxy, C₆ alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl; the alkyl and acyl groups present in the moieties are linear or branched groups, and X denotes hydrogen, C₁₋₁₈ alkyl, C₁₋₁₈ acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl and Y and Z have the meanings according to Claim 1.

6. Epothilone derivative of formula 6

[insert]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

where R = H, C₁₋₄ alkyl and R¹ = H, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ acyl, benzoyl, C₁₋₄ trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆ alkoxy, C₆ alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl; the alkyl and acyl groups present in the moieties are linear or branched groups; and Y and Z have the meanings according to Claim 1.

7. Epothilone derivative of formula 7

[insert]

where R = H, C₁₋₄ alkyl; R¹, R², R³, R⁴ = H, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ acyl, benzoyl, C₁₋₄ trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆ alkoxy, C₆ alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl and/or phenyl; the alkyl and acyl groups present in the moieties are linear or branched groups; and Y and Z have the meanings according to Claim 1.

8. Method of synthesis of an epothilone derivative of formula 7 according to Claim 7, characterized in that epothilone A, epothilone B, a 3-OH-protected derivative thereof or a 7-OH-protected derivative thereof is

- (a) enzymatically hydrolyzed in particular with an esterase or lipase or
- (b) is hydrolyzed in an alkaline medium in particular with sodium hydroxide in a methanol/water mixture and the epothilone derivative of formula 7 is obtained and isolated.

9. Method of synthesis of an epothilone derivative of formula 2 according to Claim 2, **characterized** in that an epothilone derivative of formula 7 according to Claim 7 is converted to the epothilone derivative of formula 2 or a product of the method according to Claim 7 is converted

- (a) according to the Yamaguchi method or
 - (b) according to the Corey method or
 - (c) according to the Kellogg method
- and this conversion product is isolated.

10. The method of synthesis of epothilone A and/or 12,13-bisepi-epothilone A, characterized in that epothilone C is epoxidized, in particular with dimethyldioxirane or a per acid.

11. The method of synthesis of epothilone B and/or 12,13-bisepi-epothilone B, **characterized** in that epothilone D is epoxidized, in particular with dimethyldioxirane or a per acid.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. An agent for plant protection in agriculture and forestry and/or in gardening comprising one or more of the compounds according to one of the preceding claims or one or more of these compounds in addition to one or more conventional vehicle(s) and/or diluent(s).

13. A therapeutic agent in particular for use as a cytostatic agent comprising one or more of the compounds according to one or more of Claims 1 through 7 or one or more of the compounds according to one or more of Claims 1 through 7 in addition to one or more conventional vehicle(s) and/or diluent(s).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abstract

The present invention relates to epothilone derivatives and use thereof.

THIS PAGE BLANK (USPTO)